ZUR KENNTNIS VON CLADOTHRIX DICHOTOMA COHN.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

GENEHMIGT

VON DER PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT ZU BERLIN.

VON

PAUL LINDE

aus Berlin.

Mit 7 Textfiguren.

GUSTAV FISCHER IN JENA

1913.

9

ZUR KENNTNIS VON CLADOTHRIX DICHOTOMA COHN.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

GENEHMIGT

VON DER PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT ZU BERLIN.

ACAD.
LUGD. BAT.
BIBL.

VON

PAUL LINDE

aus Berlin.

Mit 7 Textfiguren.

Tag der Promotion: 8. November 1913.

Referenten:

Professor Dr. G. Haberlandt

Professor Dr. Schwendener

Abdruck aus dem Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. II. Abteilung. Herausgegeben von Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Uhlworm in Berlin, Verlag von Gustav Fischer in Jena. 39. Band. 1913. No. 15/17.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547017_0063

Über Cladothrix dichotoma Cohn besitzen wir bereits eine größere Anzahl eingehender Untersuchungen. Dennoch schien es gerechtfertigt, eine nochmalige Bearbeitung dieses Fadenbacteriums vorzunehmen, da die letzte jener Arbeiten, eine Veröffentlichung Höflichs aus dem Jahre 1901, bereits über ein Jahrzehnt zurückliegt und dem jetzigen Stande der bakteriologischen Forschung, die besonders in den letzten 10 Jahren erhebliche Fortschritte gemacht hat, nicht mehr gerecht wird. Es war das Ziel dieser Arbeit, unter Berücksichtigung der neueren Forschungsergebnisse genaue morphologische und zytologische Untersuchungen vorzunehmen. Die Physiologie des Organismus bot neben dem rein wissenschaftlichen Interesse noch ein praktisches, da Cladothrix dichotoma zu denjenigen Bakterienformen gehört, die in der biologischen Selbstreinigung der Abwässer eine hervorragende Rolle spielen. Schließlich sollte als Drittes eine nochmalige Untersuchung der Angaben Zopfs vorgenommen werden. Zopf hatte in seiner Arbeit aus dem Jahre 1882 in Übereinstimmung mit Cienkowski besonders Cladothrix dichotoma als eine Bakterienform beschrieben, der eine große Bedeutung bei der sogenannten „Bakterienerzeugung“ zukommen sollte. Doch seine Angaben fanden bald Widerspruch. Bereits wenige Jahre später wies Winogradsky die Angaben Zopfs entschieden zurück, da er sich durch eigene Beobachtungen davon überzeugt hatte, daß „der genetische Zusammenhang“ der einzelnen Formen nicht vorhanden war. Einen großen Fortschritt bedeutete es, als es Büsgen im Jahre 1894 gelang, Cladothrix dichotoma in Reinkultur zu züchten. Auch ihm kam es im wesentlichen darauf an, auf Grund der Reinkultur eine genaue Nachuntersuchung der Angaben Zopfs über den Pleomorphismus dieser Form vorzunehmen. Das Resultat seiner Untersuchungen war eine Bestätigung der Angaben Winogradskys und damit eine endgültige Widerlegung der Ansicht Zopfs. Es folgte dann die schon oben erwähnte Arbeit Höflichs, in welcher der Verfasser auch Stellung gegen Zopf nahm. Schienen diese Fragen somit einer nochmaligen Bestätigung nicht zu bedürfen, so wurden sie doch dadurch für mich von besonderem Interesse, daß in der Zeit, während ich mit diesen Untersuchungen beschäftigt bin, eine Arbeit von Ellis erschien, in welcher der Verfasser viele von den Angaben Zopfs bestätigt und dadurch die früher viel umstrittene Ansicht Zopfs über den Pleomorphismus der Bakterien wieder aktuell macht.

Im Anschluß an diesen letzten Teil sollte noch folgendes berücksichtigt werden. Man findet in der bakteriologischen Literatur (z. B. bei Migula) häufig die Angabe, daß Cladothrix dichotoma identisch sei mit einer Form, die unter eigenem Gattungsnamen geht, mit Sphaero-

tilus natans. Außerdem soll nach einer Angabe, die auf Zopf zurückgeht, eine in faulendem Wasser häufig auftretende Bakterienform, die Zoogloea ramigera, in den Entwicklungsgang von Cladothrix dichotoma hineingehören. Es sollen also sowohl Sphaerotilus natans, als auch die Zoogloea ramigera nur Wachstumsformen von Cladothrix dichotoma sein, die bedingt werden durch ökologische Verhältnisse.

Ich möchte hier unter Hinweis auf den letzten Teil dieser Arbeit vorausnehmen, daß ich auf Grund meiner Untersuchungen zu der Überzeugung gekommen bin, daß die als Cladothrix dichotoma und Sphaerotilus natans beschriebenen Organismen identisch sind. Derselben Ansicht ist Kolkwitz. Nach ihm ist „Cladothrix dichotoma in der Regel, besonders bei einem Zelldurchmesser von 2 μ identisch mit pseudoverzweigten Exemplaren von Sphaerotilus". Von rein historischem Interesse ist, daß Kützing bereits im Jahre 1833 Sphaerotilus natans als Artbezeichnung wählte, während Cohn bekanntlich erst viele Jahre später Cladothrix dichotoma als neue Spezies beschrieb. Es würde somit also dem Namen Sphaerotilus natans Kützing das Prioritätsrecht vor der Cladothrix dichotoma Cohn zukommen. Wenn ich den von mir untersuchten Organismus dennoch als Cladothrix dichotoma Cohn bezeichne, so geschieht dies aus folgendem Grunde: Die Beschreibung und Abbildungen, die Kützing zu seinem Sphaerotilus natans gibt, lassen zwar die Deutung mit großer Wahrscheinlichkeit zu, daß hier bereits die Cladothrix dichotoma Cohns beschrieben wird, aber doch sind die charakteristischen Merkmale nicht scharf hervorgehoben. Dagegen ist die Beschreibung Cohns so genau, daß eine Identifizierung der Form ohne weiteres möglich ist. Außerdem ist der Name Cladothrix dichotoma in der Literatur gut eingebürgert.

Literatur.

Acosta und y Grande Rossi, Crón. Méd.-quirúrg. de la Habana. 1893. No. 3; Referat in Kochs Jahresber. Bd. 4. 1893. p. 55.
Büsgen, Ber. d. deutsch. botan. Gesellsch. Bd. 12. 1894. p. 147—152.
Casabo, Crónica méd.-quirúrg. de la Habana. 1894; Ref. Centralbl. f. Bakt. Bd. 17. 1895.
Cienkowski, Zur Morphologie der Bakterien. (Mém. de l'Acad. de 1877. Sér. VII. T. 25. St. Pétersbourg. No. 2.)
Cohn, Beitr. z. Biol. d. Pflanzen. Bd. 1. Heft 3. 1875. p. 185.
Ellis, Proc. Roy. Soc. Vol. 85. 1911. p. 344—358.
Eidam, Jahresber. d. Schles. Gesellsch. f. vaterl. Kult. 1876. p. 133.
Eppinger, Zieglers Beiträge. IX. 1891.
Fischer, A., Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. Bd. 27. 1895. p. 1—163.
Fischer, B., Zeitschr. f. Hyg. Bd. 13. 1893.
Flügge, Die Mikroorganismen. 1896. Bd. 2.
Garten, Deutsch. Zeitschr. f. Chir. Bd. 41. 1895. p. 257.
Günther und Rullmann, Centralbl. f. Bakt. 1896. Bd. 2.
Hesse, Deutsch. Zeitschr. f. Chir. Bd. 34.
Höflich, Österr. Monatsschr. f. Tierheilk. 26. Jahrg. 1901. Bd. 1. u. 2.
Kedzior, Arch. f. Hyg. Bd. 27. 1896.
Kolkwitz, Lafars Handb. d. Mykol. Bd. 3. p. 409 ff.
—, Wasser und Abwasser. (Handb. d. Hyg. Leipzig 1911.)
Kützing, Linnaea. Bd. 8. 1833. p. 385.
Macé, Compt. Rend. de l'Acad. d. Scienc. 1888.
Migula, System der Bakterien. Bd. 2. p. 1033.
Naunym, Mitteil. der Klin. Königsberg. 1888. p. 297.
Rullmann, Chemisch-bakteriologische Untersuchungen von Zwischendeckfüllungen

mit besonderer Berücksichtigung von Cladothrix odorifera. [Dissert.] München 1895.
—, Lafars Handb. d. Mykol. Bd. 3. p. 198.
Russel, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 11.
Sauvageau et Radais, Compt. Rend. de l'Acad. d. Scienc. T. 104. 1892.
Schikorra, Zeitschr. f. Fischer. Jahrg. VII. 1899.
Tschierschke, [Dissert.] Leipzig 1891. (Nicht gedruckt, vgl. Höflich und Ellis.)
Winogradsky, Beitr. z. Morphol. u. Physiol. d. Bakterien. Leipzig 1888.
—, Botan. Zeitung. 1888.
Winter, Rabenhorst, Kryptogamen-Flora. Leipzig 1884.
Zopf, Morphologie der Spaltpflanzen. Leipzig 1882.

Eine Ergänzung finden diese Literaturangaben in einzelnen Originalabhandlungen und Referaten in dem „Centralbl. f. Bakt.“. Diese Arbeiten, in denen die Form teils als Cladothrix dichotoma, teils als Sphaerotilus natans beschrieben wird, berücksichtigen vorzugsweise die Biologie beider Organismen. Da diese Angaben in der Hauptsache nur den Abwasserbiologen interessieren und außerhalb des Rahmens dieser Untersuchungen liegen, so ist hier die Aufzählung vermieden worden.

Aber auch die oben angeführten Arbeiten beschäftigen sich keineswegs alle speziell mit Cladothrix dichotoma bzw. Sphaerotilus natans; doch versprach ihre Berücksichtigung insofern ein Interesse, als die Autoren die von ihnen beschriebenen Formen mit Cladothrix in eine Gattung stellen, teilweise sogar sie mit dieser fälschlicherweise identifizieren. So stellt Eppinger seine Cladothrix asteroides deshalb zu den Cladothricheen, weil „sie durch aus Zellen zusammengesetzte, mit einer Scheide versehenen Fäden mit sogenannter Scheinverzweigung ausgezeichnet ist“. Aber in den Abbildungen, die Eppinger zu seiner Arbeit gibt, läßt sich deutlich eine „echte“ Verzweigung der einzelnen Zellen erkennen, eine Verzweigung, die jedenfalls vollkommen verschieden ist von der bei Cladothrix auftretenden „Scheinverzweigung“. Auf Grund ihrer sonstigen Morphologie und Physiologie ist die Cladothrix asteroides von Flügge, Höflich u. a. in die Gattung Streptothrix eingereiht worden. Bezüglich der Arbeiten von Acosta und Rossi, B. Fischer, Garten, Günther, Rullmann, Hesse, Kedzior, Macé, Naunym und Tschierschke möchte ich mich der Ansicht Höflichs anschließen, daß die in diesen Arbeiten beschriebenen Organismen zur Gattung Streptothrix gehören. Soweit aus dem oben angeführten Referat über die Arbeit Casabos die Beurteilung möglich ist, gehört seine Cladothrix chromogena wohl keinesfalls zu den echten Cladothricheen; die Angaben Russells über seine Cladothrix intricata sind nicht so weitgehend, daß man diese Form mit Cladothrix dichotoma zusammenstellen dürfte.

Schließlich sei noch hier auf diejenigen Arbeiten besonders hingewiesen, die dadurch für die vorliegenden Untersuchungen von hervorragendem Interesse waren, daß die Autoren mit Sicherheit dieselbe Form als Grundlage zu ihren Untersuchungen gewählt haben. Es sind dies die Arbeiten von Zopf, Cienkowski, Büsgen, Höflich und Ellis. Von diesen haben Zopf und Cienkowski nicht mit Reinkulturen gearbeitet, Ellis, wie er angibt, nicht in allen Fällen. Von Interesse war für mich noch eine Arbeit Schikorras über Sphaerotilus fluitans n. sp., weil der Verfasser die Reinkultur dieses Organismus

in derselben Weise wie ich gewonnen hat. Auf alle diese Arbeiten werde ich in den folgenden Ausführungen des öfteren zurückkommen.

Vorkommen.

Alle Angaben in der Literatur über das Vorkommen von Cladothrix an natürlichen Standorten stimmen darin überein, daß die Lebensbedingungen für Cladothrix gegeben sind durch einen mehr oder weniger reichlichen Gehalt des Wassers an organischen Bestandteilen, besonders stickstoffhaltigen Verbindungen (vgl. hierzu die Angaben von Cohn, Zopf u. a., besonders aber Kolkwitz). Nach Kolkwitz gehört Cladothrix zu den β-mesosaproben Formen. Sie bedarf also zu ihrer Lebenstätigkeit nicht der Eiweißstoffe, sondern kann ihren Bedarf an Stickstoff durch die Assimilation von organischen, stickstoffhaltigen Verbindungen vom Grade der Aminosäuren decken. Als besondere Kohlenstoffquellen können ihr neben Zuckerarten auch Glyzerin dienen. (Hierzu den physiol. Teil.) Die Erfahrungen, die ich beim Einsammeln des Materials gemacht habe, stimmen hiermit überein. Cladothrix dichotoma ist eine Bakterienform, die hinsichtlich der Menge des gebotenen Nährmaterials sehr genügsam ist. In Nährmedien, in denen es aus irgendeinem Grunde zur Entwicklung von anderen häufigen, fäulniserregenden Bakterienformen kommt, wird die Entwicklung der Cladothrix meist zurückgedrängt. In faulenden Algenkulturen sieht man die anfangs üppig wuchernde Cladothrix bald vollständig zurücktreten hinter anderen Organismen. An grünen, assimilierenden Ceratophyllum-Pflanzen konnte ich die Cladothrix-Fäden über einen Monat beobachten. Es scheint das letztere dadurch bedingt, daß in solchen Kulturen die nötige Versorgung mit Sauerstoff stattfindet, ein Faktor, der besonders an den natürlichen Standorten, wo Cladothrix den Kampf mit anderen Organismen aufzunehmen hat, von entscheidender Bedeutung ist. Fließendes Wasser ist daher der Entwicklung der Form außerordentlich zuträglich (über die Temperatur vgl. den physiol. Teil).

Gewinnung der Reinkultur.

Das Material für die Kulturen entstammte einem Graben, der sich in einer Breite von ungefähr 4 m neben der Machnower Schleuse (in der Nähe Berlins) hinzieht. Es ist ein Gewässer von ziemlich starkem Gefälle. Das Wasser ist verunreinigt durch organische Substanzen, die dem Ganzen selbst im durchfallenden Lichte ein trübes Aussehen geben. Das Material wurde im Juli gesammelt, einer Zeit, wo die am Rande reichlich wachsenden grünen Pflanzen in kräftiger Entwicklung standen. Von Protisten wucherten in dem Wasser außerordentlich stark Vorticellen, die einzelne Blätter mit einem dichten Filz von grauer Farbe überzogen hatten. Der Temperatur und den sonstigen biologischen Verhältnissen des Wassers entsprechend zeigte Cladothrix hier nur geringe Entwicklung. Von diesen Blättern wurden einige herausgefischt, auf das Vorhandensein von Cladothrix untersucht und in eine $\frac{1}{2}{}^0/_{00}$ starke Fleischextraktlösung gebracht (nach Büsgen und Höflich). Bei den ersten (mißlungenen) Versuchen verwandte ich Gläser von etwa $\frac{1}{4}$ l Inhalt, die nur lose mit Glasplatten bedeckt wurden. Später wählte ich hohe Glaszylinder von $1\frac{1}{2}$—2 l Inhalt, die mit einem Deckel fest verschlossen werden konnten. Die Gläser wurden z. T. bei Tageslicht und z. T. in einem dunklen Schranke aufbewahrt. Schon nach einem Tage

waren die Vorticellen abgestorben, und nach 2—3 Tagen sah man beim Bewegen des Glases, auf den Blättern befestigt, Büschel von Cladothrix flottieren. Im Gegensatz zu Büsgen und Höflich wartete ich nicht die Schwärmerbildung ab, sondern machte mit einer Pinzette die Büschel von den Blättern los und brachte sie nach gründlichem Auswaschen in frischem Leitungswasser in neue Nährlösungen. Das Ansetzen der Schwärmer an die Gefäßwand abzuwarten, fand ich deshalb nicht praktisch, weil sich mit den Schwärmern auch allerlei Verunreinigungen an den Wänden absetzen, die nicht, wie es Büsgen und Höflich bei ihren Versuchen gelang, durch häufiges Auffüllen der Gläser zu entfernen waren. Es tritt in solchen Gefäßen eine schnelle Trübung der Flüssigkeit ein und damit auch eine Verunreinigung der frei schwimmenden Flocken. Um recht viele frei schwimmende Flocken zu erzielen, ist es vorteilhaft, die mit einer einzigen Flocke beschickten Gefäße tüchtig zu schütteln. Es reißen dadurch von den Fäden einzelne Teilchen ab, und schon am folgenden Tage findet man eine größere Anzahl neuer Flocken vor. Es sind eben die abgerissenen Teilchen die Bildungszentren neuer Flocken geworden. Es ist nutzlos, solche Flocken, die unter dem Mikroskop relativ rein erscheinen, etwa in sterilisiertes Wasser oder Nährlösung zu übertragen. Immer wurde Cladothrix hier von anderen Bakterien vollkommen überwuchert. Auch alle Versuche, solche Flocken in flüssiger Gelatine zu verteilen und in eine Platte zu gießen, schlugen fehl. Immer trat eine frühzeitige Verflüssigung des Substrats ein. Nachdem durch häufiges Übertragen der einzelnen Flocken in frische Nährlösungen die Flocken als genügend rein anzusehen waren, wurden sie auf einer Gelatineplatte ausgestrichen. Diese bestand nach den Angaben von Büsgen und Höflich aus 45 g Gelatine auf 1000 ccm Wasser, versetzt mit ½ g Fleischextrakt; die Versuche, auf diesem Wege eine Reinkultur zu erzielen, hatten ein negatives Resultat. Da bei der relativ hohen Temperatur, die in den Monaten Juni und Juli herrschte, die Gelatine nur äußerst langsam erstarrte und immer von sehr weicher Konsistenz war, so wurden die Versuche mit einer Gelatine von 50 : 1000 und 75 : 1000 wiederholt, doch auch hier zeigte sich kein Erfolg. Zwar konnte häufig ein Anwachsen der Cladothrix festgestellt werden, aber immer wurde die Gelatine durch andere Organismen frühzeitig verflüssigt, so daß die Platten unbrauchbar wurden. Schließlich wurde, entgegen den Angaben Höflichs, der auf 1½-proz. Agar-Agar, versetzt mit ½‰ Fleischextrakt, kein Wachstum von Cladothrix erzielen konnte, ein Agar von 1 : 100 mit ½‰ Fleischextrakt versucht. Auch hier trat schon nach einem Tag ein Wachstum der Verunreinigungen ein, aber es hörte bald auf, wenigstens in den meisten Fällen, und vor allem trat natürlich keine Verflüssigung des Substrats ein. Bald machte sich nun ein Wachstum von Cladothrix bemerkbar. Sie wuchs gewissermaßen aus dem Hof der Verunreinigungen heraus und zwar derart weit, daß sie, ohne Gefahr die Verunreinigung zu berühren, abgeimpft werden konnte. (Von Erfolg war hier das Abimpfen mit feinen Kapillaren.) Das so gewonnene Material wurde nun auf Agar- und Gelatineplatten weitergezüchtet, gewöhnlich jedoch in kleinen Kolben von 150 ccm Inhalt, die 100 ccm 0,05-proz. Fleischextraktlösung enthielten, aufbewahrt.

Die Versuche wurden dann auf etwa 2 Monate unterbrochen. Das Material wurde in Reagensröhrchen, die mit Agar oder Gelatine und Fleischextrakt beschickt und mit Paraffin luftdicht verschlossen waren, aufbewahrt. Als nach dieser Zeit etwas von dem so aufbewahrten, reinen Material

in eine sterile Fleischextraktlösung übertragen wurde, zeigte sich, daß die Kulturen diese lange Periode ohne jeglichen neuen Sauerstoffzutritt gut überstanden hatten. Doch wuchs es in der Lösung erst nach 6—8 Tagen an.

Im Laufe der Untersuchungen wurde die Reinheit des Materials oft durch Verteilen einer Flocke in einer Gelatine- + Fleischextraktlösung geprüft.

Eine zweite Reinkultur wurde von Material gewonnen, das unter wesentlich anderen Bedingungen gewachsen war. Ich gewann es leicht, indem ich in einem mit Leitungswasser gefüllten Glase einen Moosrasen, vollkommen untergetaucht, einige Tage stehen ließ. Etwa am dritten Tage bemerkt man an einzelnen Moospflänzchen einen dichten Überzug von Cladothrixfäden. Diese Form zeigte gegenüber der ersten keinerlei abweichende Merkmale.

Allgemeiner Habitus und Gewinnung einer Einfadenkultur.

Der Habitus der Cladothrix dichotoma ist in allen größeren bakteriologischen Werken hinreichend beschrieben, so daß ich hier von einer nochmaligen genauen Beschreibung absehen möchte. Nur einige ergänzende Beobachtungen will ich anführen. Impft man eine sterile Fleischextraktlösung mit einer Flocke von einer reinen Cladothrix-Kultur, so kann man schon am folgenden Tage eine reichliche Vermehrung beobachten, wenn man die Kultur bei etwa 25° aufbewahrt. Untersucht man solche frisch herangewachsenen Fäden mikroskopisch, so erblickt man ein vollkommen einheitliches Fadengeflecht, in dem jeder Faden etwa eine Breite von kaum 2½ μ besitzt (die Scheide nicht mitgerechnet).

Auffällig ist die Tatsache, daß schon nach wenigen Tagen der einheitliche Charakter der Kultur verloren gegangen ist. Es sind jetzt deutliche Unterschiede in der Breite der einzelnen Fäden aufgetreten, und zwar schwankt der Durchmesser zwischen 2 μ und 1 μ. Diese Tatsache ließ die Vermutung aufkommen, daß ich nicht eine absolute Reinkultur gewonnen hatte, sondern daß vielleicht eine Mischkultur verschiedener Spezies vorlag, die durch die Differenz in der Breite der Fäden unterschieden waren. Um dies zu entscheiden, wurde nach dem Burrischen Tuschepunkt-Verfahren eine Einzellkultur gewonnen. Zu diesem Zwecke wurde eine Flocke in gewöhnlicher, käuflicher (Günther-Wagner) Tusche 1 : 10, die vorher sterilisiert worden war, mit ausgeglühtem Platindraht stark zerzaust und dann die Punkte auf der Gelatineplatte (75 g Gelatine: 1000 H_2O—0,5 g Fleischextrakt) angebracht. (Die für das Wachstum von Cladothrix zuträglichere Gelatine von 45—50 g auf 1000 g H_2O erwies sich wegen ihrer geringen Konsistenz als unbrauchbar.)

Unter dem aufgelegten Deckglase wurden die einzelnen Fadenstücke genau kontrolliert. Als Ausgangspunkt wurde ein solcher Tuschepunkt gewählt, der ein einziges, vollkommen einheitliches Fadenstück enthielt. Es wurde genau darauf geachtet, daß kein Schwärmer seitlich anhaftete, und daß auch sonst kein Schwärmer in dem betreffenden Tuschepunkt zu beobachten war. Unter mikroskopischer Kontrolle wuchs dann der isolierte Faden unter dem Deckglas in meist 3 Tagen zu einem Rasen heran, der bei genügender Entfernung der einzelnen Tuschepunkte ohne Gefahr der Berührung mit anderen Rasen abgeimpft werden konnte. Meist blieben die Rasen beim Abheben des Deckglases in der Gelatine stecken. Das Verfahren wurde dreimal ausgeführt. Die so gewonnene „Einfadenkultur" zeigte ebenfalls den charakteristischen Breitenunterschied in den einzelnen Fäden. Es

steht also somit fest, daß der Querdurchmesser der verschiedenen Fäden von Cladothrix dichotoma einer erheblichen Variabilität unterliegt, und zwar schwankt er zwischen 2,5 und 1 μ. Im Zusammenhange mit dieser Tatsache sei hier hervorgehoben, daß trotz der geringen Breite einzelner Cladothrixfäden in Reinkulturen nie jene außerordentliche Feinheit der Fäden beobachtet wurde, wie sie die Leptothrix zeigt, welche man gewöhnlich in Cladothrixkulturen beobachtet, die natürlichen Standorten entnommen werden. Es kann diese Beobachtung als ein Argument gegen die Annahme Zopfs angeführt werden, der einen Übergang der „Leptothrixform" in die „Cladothrixform" konstruieren wollte.

Die vegetativen Zellen.

Die Größe der vegetativen Zellen schwankt außerordentlich mit den Ernährungsbedingungen und dem Entwicklungsstadium der einzelnen Fäden. Unter normalen Bedingungen sind die einzelnen Zellen etwa 2—2½ μ breit und etwa 3—5-mal so lang (vgl. vorigen Abschnitt). In Keimpflänzchen, die man dadurch erhält, daß man auf einer Kultur ein steriles Deckglas etwa 24 Stunden schwimmen läßt (vgl. folg. Abschnitt u. Abbild. 3) sind die ersten Zellen fast alle von gleicher Größe und von normaler Form. Da die Schwärmer, aus denen doch jene Keimpflänzchen hervorgegangen sind, außerordentliche Größenunterschiede zeigen, ist wohl anzunehmen, daß sie nach dem Festheften an die Unterlage erst die normale Zellform „regenerieren" und dann zur Teilung schreiten.

Interessant ist, daß man in einer Kultur, in der dem Organismus noch reichlich Nährmaterial zur Verfügung steht, und Stoffwechselprodukte noch nicht in schädigender Menge vorhanden sind, selbst bei starker Vergrößerung (Zeiss Ok. 12. Öl.-Im. 2 mm) keine Querwände an der Mehrzahl der Fäden erkennen kann. Man erblickt einheitliche Fäden und in diesen zahlreiche, stark lichtbrechende Kügelchen (Fett und Volutin, vgl. jenen Abschnitt). Kurze Fadenstücke sehen einer schwefelfreien Beggiatoa außerordentlich ähnlich, nur daß ihnen natürlich jede Beweglichkeit fehlt (vgl. Kolkwitz).

Die Zellteilung erfolgt immer in der Querrichtung. Man kann sie leicht beobachten, wenn man das Material in eine starke Jod-Jodkaliumlösung (A. Meyer, Prakt., Anhang) bringt. An einem einzigen Faden beobachtet man deutlich alle Übergänge von der Wandbildung an den Seiten der Zelle bis zur allmählichen Durchschnürung nach der Mitte zu.

Die Zellen, die anfangs eng aneinanderschließen, lassen bald deutliche Zwischenräume zwischen sich erkennen, besonders in älteren Kulturen. Diese Erscheinung findet wohl darin ihre Erklärung, daß die Scheide an der Spitze platzt, und die Spitzenzellen als Schwärmer austreten und so den nachdrängenden Zellen Raum geben. Querbalken, wie sie Ellis in seinen Kulturen beobachtet hat, und die dadurch entstehen sollen, daß sich „transverse bars of the same material as the sheath" zwischen die Zellen schieben, habe ich nicht beobachten können. Zwischen vielen, schon vollkommen ausgewachsenen Zellen sieht man deutlich bei Färbung mit Methylenblau eine feine, protoplasmatische Verbindung erhalten (A. Meyer, Flora. Bd. 84. 1897, Taf. VI. Fig. 54).

An den Enden der Fäden wird die Zellteilung oft so lebhaft, daß die entstehenden Tochterzellen bedeutend unter die Länge der normalen Zellen herabsinken und fast isodiametrische Form annehmen. Es ist dies das be-

reits von Zopf beschriebene „Kokkenstadium". In älteren Kulturen, in denen also keine normalen Ernährungsbedingungen mehr herrschen, treten oft abnorm gestaltete, besonders keulig angeschwollene Zellen auf. Es sind dies Involutionsformen, die keinerlei besonderes Interesse bieten. Büsgen hat in seinen Kulturen Ähnliches beobachtet und gibt davon auch einige Abbildungen (vgl. hierzu den Abschnitt über „Fortpflanzung").

Die normalen Zellen zeigen oft die Tendenz, eine Schräg- bis Querstellung gegen die Fadenrichtung einzunehmen, so daß oft merkwürdige Verschiebungen innerhalb der Scheide eintreten. (Man vgl. Fig. 1 und die Abbild. bei Zopf, Büsgen und Cienkowski.) Man erkennt deutlich, daß die Scheide dieser eigentümlichen Bewegung der Zellen Widerstand leistet, so daß es leicht dazu kommt, daß einzelne Zellen aneinander vorbeiwachsen und so mehrere Zellenreihen innerhalb derselben Scheide bilden. Eine Erklärung für die Tatsache der Verlagerung überhaupt könnte wohl darin zu suchen sein, daß in der Schrägstellung der Zellen der Beginn der Verzweigung liegt, und daß so weitgehende Verlagerungen nur dann vorkommen, wenn die Scheide aus unbekannten Ursachen nicht durchbrochen wird und keine Zweigbildung eintritt. Doch bleibt es unerklärlich, daß nur einige Fäden diese Verlagerung der Zellen zeigen und dann nicht nur auf kurze Strecken, sondern fast durch den ganzen Faden.

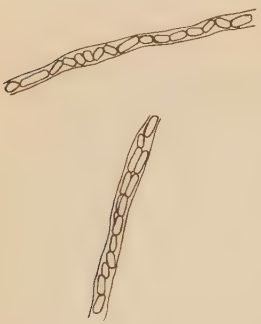

Fig. 1. Verlagerung der Zellen innerhalb der Scheide. Vergr. etwa 400 ×

Über den Inhalt der vegetativen Zellen geben die meisten Autoren nichts Näheres an. Büsgen beobachtete in dem Protoplasma bei reichlicherer Ernährung stark lichtbrechende Tröpfchen. Cienkowski sah bei reicher Nahrungszufuhr eine so starke Aufspeicherung von Reservestoffkörnchen, daß sie die Membran der Zellen „ausstülpten, ihnen eine gekerbte Oberfläche verleihend". Nur Ellis macht genauere Angaben. Er hat neben Fett auch Glykogen als Reservestoff beobachtet, doch gibt er über die genauere Identifizierung beider durch Reagentien nichts an.

Meine eigenen Beobachtungen gehen dahin, daß unter normalen Bedingungen in den Zellen immer stark lichtbrechende Körnchen vorhanden sind, die durch Zusatz von Reagentien als Volutin oder teilweise auch als Fett erkannt wurden.

Volutin.

Nach den Angaben A. Meyers (Zelle der Bakterien. p. 238 ff.) wurde das Volutin durch folgende, für diesen Stoff charakteristische Reaktion nachgewiesen: Die Fäden wurden 3—5 Minuten in eine verdünnte Methylenblaulösung (1 : 10) gelegt und darauf mit 1-proz. Schwefelsäure differenziert. Das Volutin hob sich dann in Form tiefblau gefärbter, kugel- bis ovalförmiger Körperchen deutlich von dem vollkommen entfärbten Protoplasma ab. Zur genaueren Identifizierung wurde das Verhalten des Volutins gegen Fixierungs- und Lösungsmittel geprüft. Als „gelöst" wurde in folgendem das Volutin dann angesehen, wenn es sich nach der Methylenblau-Schwefelsäuremethode nicht mehr nachweisen ließ (vgl. Grimme, Centralbl. f. Bakt. Bd. 19). Das Material zu diesen Untersuchungen stammte immer aus Lö-

sungen von $^1/_2$ $^0/_{00}$ Gehalt an Fleischextrakt und war immer 24—48 Stunden alt.

Löslichkeit ohne vorherige Fixierung.

Kochendes Wasser löste das Volutin nach 1—2 Minuten. In Wasser von 80° in einigen Zellen bereits nach 5 Minuten, nach 10 Minuten in allen Zellen gelöst. In Wasser von 50° erst nach ½ Stunde vollständig gelöst (Zellen vorher 1—2 Minuten in 25-proz. Alkohol). Wurden die Zellen durch Liegen in 25-proz. Alkohol (1—2 Min.) abgetötet, so löste sich das Volutin in Wasser von Zimmertemperatur nach 24—48 Stunden vollständig. Ebenso in 1-proz. H_2SO_4 nach 24 Stunden, 5-proz. H_2SO_4 nach 5 Minuten, 5-proz. KOH und Na_2CO_3 löst das Volutin sofort.

1-proz. Na_2CO_3-Lösung bereits nach 1—2 Minuten (vorher abgetötet).

Beständiger ist das Volutin gegen Chloralhydrat, erst gelöst nach 5—10 Minuten langer Einwirkung.

Nach vorheriger Fixierung

in absolutem Alkohol (bis 24 Stunden), in Formol, Osmiumsäure (10 Minuten), konz. Pikrinsäurelösung (20 Minuten bis 1 Stunde), Flemmingscher Lösung (1 Stunde) wurde folgendes beobachtet: Nie wurde das Volutin derart fixiert, daß es unlöslich wurde in kochendem Wasser oder Wasser von Zimmertemperatur. Schwer löslich wurde es besonders nach Behandlung mit absolutem Alkohol, Flemmingschem Gemisch, doch löste es sich nach 5 Minuten langem Kochen oder nach 48 Stunden in Wasser von Zimmertemperatur. Ebensowenig wurde das Volutin fixiert durch schärferes Antrocknen an dem Deckglas, doch wurde es hierdurch schwerer löslich in kochendem Wasser.

Unlöslich war das Volutin

in Chloroform, Äther und Xylol.

Die vorstehenden Reaktionen decken sich im wesentlichen mit den Angaben A. Meyers und Grimmes bei ihren Untersuchungen über einige andere Bakterienspezies. Der Schluß ist wohl berechtigt, hier identische Stoffe anzunehmen.

Das Volutin war ein überaus typischer Bestandteil der Zellen und zwar auf allen Entwicklungsstadien; es fehlte keineswegs den Schwärmern; der Gehalt an Volutinkörnchen schwankte mit den Ernährungsbedingungen. Relativ große Körnchen traten in den Zellen auf, die in nitrathaltigen Lösungen wuchsen. Standen die Kulturen etwa 1—1½ Monate, so waren aus den Zellen fast alle Inhaltskörperchen verschwunden, bis auf ein einziges, stark lichtbrechendes Körnchen, das meist die Mitte der Zellen einnahm. Die Untersuchung lehrte, daß es sich ebenfalls um ein Volutinkörnchen handelte. Da über die chemische Natur und die Bedeutung des Volutins bisher noch keineswegs volle Klarheit herrscht, und die Meinungen der bakteriologischen Forscher noch weit auseinandergehen, so will ich hier kurz die Gründe anführen, die mich veranlaßten, in dem Volutin einen Reservestoffkörper zu sehen, in Übereinstimmung mit A. Meyer, der das Volutin zuerst als solches charakterisierte. Vor allem bestimmte mich hierzu die Periodizität im Auftreten der Volutinkörnchen, die vollkommen bestimmt wurde durch die Ernährungsbedingungen. Hierzu kommen die außerordentlichen Größenunterschiede zwischen den in einer Zelle befindlichen Körnchen und die Tatsache, daß bei reicher Nahrungszufuhr die Größe der Körnchen außer-

ordentlich zunahm. Schließlich sei hier vorausgenommen, daß ich glaube, neben dem Volutin chromatische Substanz nachgewiesen zu haben.

Fett.

Der Nachweis von Öltropfen gelang E l l i s nur in Rohkulturen, in künstlichen Kulturen konnte er nie Fett nachweisen, wie er glaubt, waren die Bedingungen in künstlichen Kulturen der Ölbildung nicht günstig. Entgegen den Beobachtungen von E l l i s konnte ich in allen von mir angesetzten, künstlichen Kulturen neben dem Volutin in den Zellen einen mehr oder minder reichlichen Gehalt an Fett beobachten. Der Nachweis gelang mit folgenden drei Reagentien:

Rotfärbung mit Sudan III (10 Min.)
Gelbfärbung mit Diamidoazobenzol
Rotfärbung mit Alkanninlösung
} vgl. A. M e y e r, Zelle der Bakterien. p. 227 ff.

Fig. 2. Fett (helle Kreise) und Volutin (schwarze Kreise). Doppelfärbung. Vergr. etwa 700 ×

Das Fett konnte durch Chloroform aus den Zellen extrahiert werden. Es ist diese Tatsache deshalb bemerkenswert, weil nach A. M e y e r (Zelle d. Bakt. p. 287) die Extrahierung des fetten Öles durch Chloroform bei vielen Bakterienspezies nicht gelingt. Wie zu erwarten war, blieben dann die angeführten Fettreaktionen aus. An Stelle der Fettropfen sah man jetzt deutlich Vakuolen.

Der Gehalt an Fett war in Kulturen in ½ ‰ Fleischextrakt nach 24—48 Stunden sehr gering oder überhaupt nicht nachweisbar. Es trat dann bald eine erhebliche Steigerung im Fettgehalt auf, die nach einigen Tagen wieder allmählich zurückging. Oft nahmen die Öltropfen, besonders in Kulturen mit Gehalt an Zucker und Glyzerin, so an Größe zu, daß zwei oder drei von ihnen fast die ganze Zelle ausfüllten. Besonders schöne Bilder gaben Kulturen, die bei einer Temperatur von 30—35° C gewachsen waren. Nach 24 Stunden konnte man hier in den Zellen eine größere Zahl winziger Fettröpfchen beobachten.

Material von natürlichen Standorten zeigte ebenfalls Volutin und Fett in den Zellen.

Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß eine Doppelfärbung leicht durch folgende Behandlung gelang[1]). Das Material wurde 10 Minuten in der Sudanlösung gründlich durchgefärbt, darauf in Wasser abgespült, 3—5 Minuten mit Methylenblau gefärbt und differenziert wie oben. Es treten nach dieser Behandlung die rot gefärbten Fettröpfchen deutlich neben den tiefblauen Volutinkörnchen hervor. Es gewinnt oft den Anschein, als ob die Volutinkörnchen im Fett eingebettet liegen (vgl. Abbildung 2).

Iogen und Glykogen.

Iogen konnte ich in den Zellen nicht nachweisen. Mit verdünnter Jodjodkaliumlösnng trat keine Blaufärbung ein. Nach den Angaben A. M e y e r s

[1]) Diese Doppelfärbung wurde bereits von G r i m m e angewendet (vgl. A. M e y e r, Praktikum, Abbild. im Anhang). An Stelle des Sudans verwandte er Diamidoazobenzol.

(Zelle d. Bakt. p. 210) lassen sich Iogen und Glykogen nur durch ihr Verhalten gegenüber starker Jod-Jodkaliumlösung auseinanderhalten. Doch ist bei der Anwendung dieses Reagens eine Vorsicht zu beachten. Da die Zellen von Cladothrix dichotoma Öl enthalten, so erhält man beim Zusatz der starken Jod-Lösung in den Zellen eine größere Anzahl rotbraun gefärbter Tröpfchen. Wie man sich leicht überzeugen kann, haben die Öltröpfchen diese Farbe angenommen. Extrahiert man das Öl vor der Behandlung mit der Jodkalium-Lösung, so kann man leicht beachten, daß jetzt nicht mehr rotbraun gefärbte Tröpfchen in den Zellen auftreten. Ein Beweis dafür, daß in der Tat die Öltropfen, die vorher in den Zellen waren, die rotbraune Färbung angenommen hatten, daß also Glykogen fehlt.

Untersuchung auf das Vorhandensein von Kernen.

Genauere Angaben über Kernuntersuchungen bei Cladothrix dichotoma bzw. Sphaerotilus natans fand ich nur bei A. Fischer (Vorlesungen üb. Bakterien. 2. Aufl. 1903. p. 7 f.) und bei Swellengrebel (Arch. f. Hyg. Bd. 70. 1909. p. 380). Die Abbildungen Fischers lassen in den einzelnen Zellen einige scharf hervortretende Körnchen erkennen, die einem farblosen Plasma eingelagert sind. Fischer sieht in diesen Körnchen keineswegs „echte" Kerne. Ich möchte auf Grund der Abbildungen und Beschreibungen annehmen, daß diese Körnchen identisch sind mit Volutin. Weitgehender sind die Angaben Swellengrebels. Er geht von demselben Gesichtspunkte aus, der mich bei diesen Untersuchungen leitete. Ich sehe in dem Volutin einen Reservestoffkörper, der mit der echten chromatischen Substanz nichts zu tun hat, und es war mein Bestreben, neben dem Volutin Chromatinkörnchen oder vielleicht einen einzigen Kern nachzuweisen. Meine Erfahrungen bei diesen Untersuchungen waren die, daß es wegen der geringen Größe des Objektes unerläßlich ist, aus der Zelle, auch bei Anwendung sogen. spezifischer Chromatinfarbstoffe, alle übrigen Inhaltskörnchen, also hier Fett und Volutin, herauszulösen, natürlich ohne Schädigung der etwa vorhandenen chromatischen Substanz. Nur unter dieser Bedingung glaubte ich mich berechtigt, etwa übrig bleibende gefärbte Körnchen als Chromatin zu deuten (vgl. A. Meyer, Zelle der Bakterien). Swellengrebel hat diese Bedingung bei seinen Untersuchungen nicht erfüllt.

Das Material zu diesen Untersuchungen entnahm ich dem unten (s. u. Temperatur) angegebenen Standort. Es wurde fixiert mit einer Lösung von 10 g Sublimat, 100 ccm Alkohol, 100 ccm H_2O, 2 ccm Eisessig. Die Fixierungsflüssigkeit wurde zum Sieden erhitzt, das Material hineingeworfen und darin 1 Stunde unter allmählichem Erkalten der Lösung gelassen. Darauf wurde das Material durch häufiges Übertragen in frisches Leitungswasser etwa 6 Stunden lang ausgewaschen und danach noch etwa 12—14 Stunden in 25-proz. Alkohol liegen gelassen. Nach außerordentlich langsamer Überführung durch die verschiedenen Alkoholstufen, bis zu abs. Alkohol, wurde es noch 24 Stunden in Chloroform übertragen. Schließlich wurde das Material aus dem Alkohol in einem Gemisch von 1 Teil Alkohol abs., 1 Teil Glyzerin und 1 Teil Wasser für die weitere Behandlung mit Farbstoffen aufbewahrt (vgl. Sieben, Einführung in die botanische Mikrotechnik. Jena 1913). Diese Art der Fixierung in einer heißen, wässerigen Lösung hatte den Erfolg, daß die Volutinkörnchen vollkommen herausgelöst waren. In keiner der

Zellen konnte ich nach der Methylenblau-Schwefelsäure-Methode Volutin nachweisen. Das Fett war durch die Behandlung mit Chloroform extrahiert worden. Neben dieser Fixierung wurden noch versucht solche mit schwachem Flemmingschen Gemisch und mit Osmiumsäure. Diese erwiesen sich als weniger geeignet, da es einige Schwierigkeit bereitet, das Volutin zu zerstören. Es gelingt zwar durch längeres Verweilen des Materials in heißem Wasser, doch treten hierbei immer weitgehende Deformierungen der Zellen ein.

Als Färbemittel erwies sich Eisen-Hämatoxylin als am meisten geeignet. Die Herstellung der Lösungen erfolgte genau nach der von Sieben (s. o.) angegebenen Vorschrift. Sowohl in der Alaun- wie in der Hämatoxylinlösung verblieben die Zellen je 24 Stunden. Differenziert wurde in der Weise, daß eine größere Anzahl von Flocken gleichzeitig in der Alaunlösung lagen. Nach etwa 2 Minuten wurde die erste Flocke herausgenommen, etwa ¼—½ Minute später eine zweite usf., bis etwa nach 5—6 Minuten die letzte der Flocken herausgenommen wurde. Ich erhielt so alle Übergangsstadien von solchen Fäden, bei denen die Differenzierung eben begann und solchen, die schon vollkommen farblos waren. Eine schöne Kontrolle für die richtige Wirksamkeit des Farbstoffes bestand darin, daß mit den Cladothrixfäden einige Infusorien, viele Diatomeen und der in Abwässern häufig auftretende Pilz Leptomitus mit fixiert und gefärbt worden waren. Auch an diesen Objekten beobachtete man deutlich alle Übergangsstadien von eben beginnender bis zu weit vorgeschrittener Differenzierung. In allen trat der Kern immer deutlich hervor, eine Tatsache, die für die vorliegenden Untersuchungen von Bedeutung war.

Die Cladothrixzellen boten folgendes Bild. In einem vakuolären Protoplasma, das oft bis zur völligen Farblosigkeit differenziert war, konnte man deutlich eine größere Anzahl distinkter Körnchen (5—8) unterscheiden. Ein einziger Kern war jedenfalls nicht nachweisbar. Besonders klare Bilder erhielt ich, wenn das Material vor dem Übertragen in Kanadabalsam etwa 24 Stunden in Nelkenöl verblieb (vgl. darüber die Angaben bei Sieben). Die Körnchen lagen meist zu mehreren hintereinander an den Seitenwänden der Zellen, doch traten auch Unregelmäßigkeiten auf, so daß einzelne Körnchen mitten in der Zelle zu liegen kamen. Gegenüberliegende Körnchenreihen standen durch feine protoplasmatische Fäden in Verbindung. Besonders auffällig war in einzelnen Zellen die Ausbildung von „hellen Kuppen" an den Polen der Zelle. Das Plasma war an diesen Stellen vollkommen homogen und zeichnete sich gegenüber den anderen Teilen der Zelle durch stärkere Lichtbrechung aus. Körnchen wurden in diesen Kuppen nicht beobachtet. Ähnliches gibt schon Bütschli für andere Bakterien an. Fischer sieht in diesen hellen Enden aber nur Kunstprodukte, die durch Plasmolyse entstanden sind (Fischer, Cyanophyceen und Bakterien. Jena 1897). Meine Beobachtungen bestätigen aber die Angaben Bütschlis, daß kein Kunstprodukt vorliegt.

Ein Vergleich dieser Bilder mit den Abbildungen, die einige neuere Autoren über Kernuntersuchungen bei Bakterien veröffentlicht haben, ergab eine besonders gute Übereinstimmung mit den Befunden Guillermonds. Guillermond bildet (z. B. Bacillus mycoides) eine Anzahl von Chromatinkörnchen ab, die in einem vakuolären Protoplasma eingebettet sind. Diese Körnchen liegen auch hier vorzugsweise an den Seitenwänden der Zellen und stehen durch feine protoplasmatische Brücken in Verbindung

Eine ähnliche Übereinstimmung zeigten die Abbildungen Swellengrebels über seine Kernuntersuchungen bei Spirillen, doch mit dem Unterschiede, daß die Chromatinkörnchen weniger deutlich, die Protoplasmalamellen um so deutlicher hervortreten (Guillermond, Ref. im Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910. p. 450 und Swellengrebel, Arch. f. Hyg. Bd. 70). Die Deutungen, die beide Forscher ihren Befunden geben, weichen wesentlich voneinander ab. Während Guillermond eine Verteilung des Chromatins über die ganze Zelle annimmt und demzufolge von einem „Chromodialapparat" spricht, neigt Swellengrebel zu der Ansicht, daß ein spiralförmiger Einzelkern vorliegt, indem er die die Zellen quer durchsetzenden Lamellen mit zur Kernsubstanz rechnet. Diese Frage, ob ein Einzelkern oder Chromidialgerüst vorliegt, war auf Grund meiner Präparate nicht zu entscheiden, auch halte ich sie nach den bisher bekannten Tatsachen noch nicht für spruchreif. Etwaige Umlagerungen der Chromatinkörnchen habe ich nicht beobachten können. Swellengrebel hat besonders bei seinen (oben erwähnten) Untersuchungen über Sphaerotilus solche Umlagerungen der Kernsubstanz beobachtet und zwar oft in Beziehung zur Zellteilung. Seine Bilder entsprechen keineswegs den von mir beobachteten. Das Vorhandensein der Reservestoffe in den Zellen und das Antrocknen des Materials hat wahrscheinlich zu Täuschungen Anlaß gegeben.

Die Scheide.

Über die Natur der bei den verschiedensten Bakterienspezies so außerordentlich charakteristisch auftretenden Schleimschicht hat man bisher nur in einigen wenigen Fällen durch makrochemische Untersuchungen einige Aufklärung erhalten können (man vgl. die Zusammenstellung bei A. Meyer, Zelle der Bakterien. p. 141 ff.). Da über das Verhalten der Scheide von Cladothrix dichotoma gegenüber den gebräuchlichen chemischen Reagentien in der Literatur keine Angaben zu finden waren, gebe ich im folgenden eine Aufstellung dieser Reaktionen, ohne natürlich hieraus bestimmte Schlüsse auf die chemische Natur der Scheide zu ziehen.

Keine bestimmten Färbungen traten ein durch Behandlung mit Jodwasser, Jod-Jodkaliumlösung (auch in stärkerer Konzentration), Chlorzinkjod (nach der von Nowopokrowsky angegebenen Methode der getrennten Behandlung mit Jod-Jodkalium-Chlorzinklösung (Sonderabdr. aus d. Beiheft. z. Botan. Centralbl. Abt. I. Bd. 28. 1911). Ohne Erfolg war auch eine Kapselfärbung nach Ribbert (Migula. p. 60).

Eben so wenig wie durch diese Reagentien gelang Intensivfärbung mit Methylenblau, Methylviolett und Gentianaviolett. Besser glückt hier die Färbung nach scharfem Antrocknen der Präparate am Deckglas oder vorherigem Beizen mit Tanninlösung (vgl. Höflich).

Löslich war die Scheide in: konz. H_2SO_4 sofort, in 50 Proz. H_2SO_4 langsamer als die Membran der Zellen.

Unlöslich war die Scheide in: 5 Proz. H_2SO_4, Kalilauge bis 60 Proz., Kupferoxydammoniak.

Wurden die Scheiden etwa 15 Minuten in 60-proz. KOH auf 170° erhitzt, so war nach Bedandlung mit Jodjodkalium und darauffolgendem Auswaschen mit 1-proz. H_2SO_4 eine deutliche Blaufärbung der Scheiden zu beobachten. Eine schwächere Färbung trat ein durch Behandlung mit Chlorzinkjod, doch verquollen die Scheiden außerordentlich stark. Eine Violettfärbung, wie sie das Chitin von Krustaceenschalen in einem Parallelversuch

zeigte, war jedenfalls nicht zu beobachten. (Viehoever hat neuerdings in den Membranen einiger Bakterienspezies Chitin nachweisen können.) Statt des Erhitzens auf 170° genügte auch ein einstündiges Kochen im Dampftopf oder mehrere Tage langes Stehenlassen bei Zimmertemperatur.

Die Membran der Zellen wurde bei solchen Versuchen zu weitgehend zerstört, als daß sich irgendwelche Färbungen mit Bestimmtheit erkennen ließen. Besser erhalten blieben die Membranen, wenn man die Zellen vorher scharf plasmolysierte und dann die Plasmolyse in absolutem Alkohol fixierte. Die so vom Plasma getrennten Membranen gaben mit Jodjodkalium und Chlorzinkjod keine Blaufärbung.

Fig. 3. Fäden in den ersten Stadien der Entwicklung aus Schwärmern. Vergr. etwa 550 bzw. 700 ×

Die Ausbildung der Scheide erfolgt sehr frühzeitig. Schon auf dem Zweizellenstadium konnte ich sie mit Sicherheit erkennen (Fig. 3). Im übrigen schwankt der Querdurchmesser der Scheiden außerordentlich. In den Kulturen zeigten einige Fäden oft einen Querdurchmesser von 6 μ, wenn man die Scheiden mit einrechnete. Beobachtungen an ungefärbtem oder gefärbtem Material führen hier leicht zu Täuschungen. Wahrheitsgetreue Bilder erhält man, wenn man das Material in verdünnter Tusche liegend beobachtet. (Vielleicht erklären sich so die abweichenden Angaben Höflichs.)

Die Verzweigung.

In den Abbildungen, die in verschiedenen Werken von Cladothrix dichotoma gegeben werden und die besonders die falsche Dichotomie veranschaulichen sollen, kann man deutlich zwei Darstellungen der falschen Verzweigung auseinanderhalten. Einmal sieht man die Seitenzweige gewissermaßen dem Hauptstamm nur seitlich angeklebt, so daß Haupt- und Nebenast eine X-förmige Figur bilden, oft auch ohne Ausbildung eines unteren Astes an dem letzteren (s. Schema I und II in Abbild. 4). Eine zweite Darstellung zeigt dann eine direkte Aufteilung der Scheide mit fast gleicher Ausbildung von Haupt- und Seitenzweig (s. Schema III).

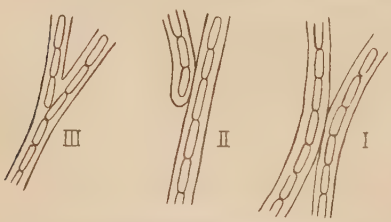

Fig. 4. Verzweigungsschemata.

Cohn hatte wohl die erste Art der Zweigbildung im Auge, wenn er sie dadurch entstanden erklärt, „daß ein Faden sich in der Mitte in eine

untere und obere Hälfte durchfurcht; indem beide Hälften am Scheitel fortwachsen, verlängert sich die untere in unmittelbarer Fortsetzung neben der oberen, welche dadurch als scheinbarer Ast an die Seite gedrängt wird. Die X-Form entsteht, wenn die obere Hälfte an beiden Enden sich mehr oder weniger verlängert". Cienkowski will die erste Art der Verzweigung als „unechte" von der zweiten Art als „wahre" Verzweigung unterschieden wissen. Ellis macht darauf aufmerksam, daß die erste Art der „falschen" Verzweigung dadurch zustande kommt, daß sich Schwärmer an älteren Fäden festsetzen und dann zu „Seitenzweigen" auswachsen.

Seiner Beobachtung möchte ich beipflichten, da ich sie durch folgende noch wahrscheinlicher machen konnte. Hält man eine mit 2—3 Flocken geimpfte Nährlösung etwa bei 15°, so wachsen die Flocken stark heran, ohne daß, wie sonst, die Schwärmer sich an den Wänden festsetzen und neue Fadenbüschel bilden oder auch sonst die ganze Lösung mit neugebildeten Flöckchen anfüllen. Nimmt man nach einigen Tagen eine solche hineingeimpfte Flocke heraus, so beobachtet man unter dem Mikroskop, daß zwischen den einzelnen Fäden eine außerordentlich große Zahl von Schwärmern umherschwärmt. Die Erklärung dafür, daß die Schwärmer innerhalb des Bereichs des Fadengewirrs blieben und nicht in das umgebende Nährmedium ausschwärmten, liegt wohl darin, daß die niedrige Temperatur hemmend wirkte. Wenn aber eine so große Zahl von Schwärmern zwischen den Fäden verblieb, so war die Wahrscheinlichkeit des Anheftens an diese außerordentlich erhöht, und die erste Art der Verzweigung, nur eine Nachahmung der falschen Verzweigung, mußte besonders häufig zu beobachten sein. In der Tat bestätigte die Untersuchung diese Annahme.

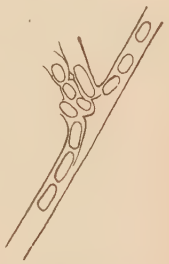

Fig. 5. Trichotome Verzweigung. Vergr. etwa 700 ×

Genauere Bilder von allen Phasen der falschen Verzweigung erhält man, wenn man die Flocken in sterilem Wasser zerteilt und dann nach Art der Geißelpräparate von diesem Material Präparate herstellt. Daß es leicht vorkommen kann, daß mehrere Zellen die Scheide durchbrechen und so mehrfache Verzweigungen auftreten, zeigt Fig. 5, die den Beginn einer trichotomen Verzweigung erkennen läßt.

Fortpflanzung.

Die längst durch Zopf bekannt gewordene Fortpflanzung der Cladothrix dichotoma durch schwärmende Gonidien, glaubte Höflich dahin erweitern zu können, daß er in den ausschwärmenden Zellen selbst Sporenbildung beobachtete und diese Schwärmzellen als „Zoosporen" bezeichnete. Daneben beobachtete er auch Fortpflanzung durch „unbewegliche Gonidien".

Ellis hat nie irgendwelche Sporenbildung beobachten können, und ich möchte hier vorausschicken, daß auch in meinen Kulturen nie echte Sporenbildung auftrat. Auf Grund seiner sonstigen Beobachtungen kam Ellis zur Unterscheidung folgender fünf Arten der Fortpflanzung, durch:

a) Rod-shaped swarm cells,
b) Spirally-shaped swarm cells,
c) Rod-shaped swarm fragments,
d) Spirally-shaped swarm fragments,
e) Rod-shaped non motile fragments.

Die unter a aufgeführten Formen sind die bekannten schwärmenden Gonidien. Die unter c angeführten Formen sollen wohl nichts anderes bezeichnen, als Fadenstücke, die losgerissen, das Vermögen besitzen, wieder zu neuen Pflanzen auszuwachsen. Derartiges konnte ich leicht im Tuschepunkt beobachten. Die unter b angeführten Formen bezeichnen vielleicht Ketten von Schwärmern, die ich, bis zu fünf aneinandergereiht, durch das Substrat fortschwimmen sah. Auch glaube ich eine Kette beobachtet zu haben, an der nur ein Endglied durch aktive Bewegung die anderen Zellen nach sich zog. Dagegen habe ich eigenbewegliche Fadenstücke, wie sie etwa auch Z o p f eingehend nach ihrem Zustandekommen beschreibt und polar begeißelt abbildet, nie beobachten können. Desgleichen traten spiralförmig gestaltete Zellen (b) und spiralförmige „bewegliche“ Fadenteile (d) nie in meinen Kulturen auf.

Die Angaben A. F i s c h e r s, daß die Schwärmer von C l a d o t h r i x d i c h o t o m a eine subpolare Begeißelung zeigen, wurde durch H ö f l i c h bestätigt. Die Geißelpräparate, die ich nach der genauen Vorschrift A. M e y e r s, Prakt. der botan. Bakterienk. p. 51, anfertigte,

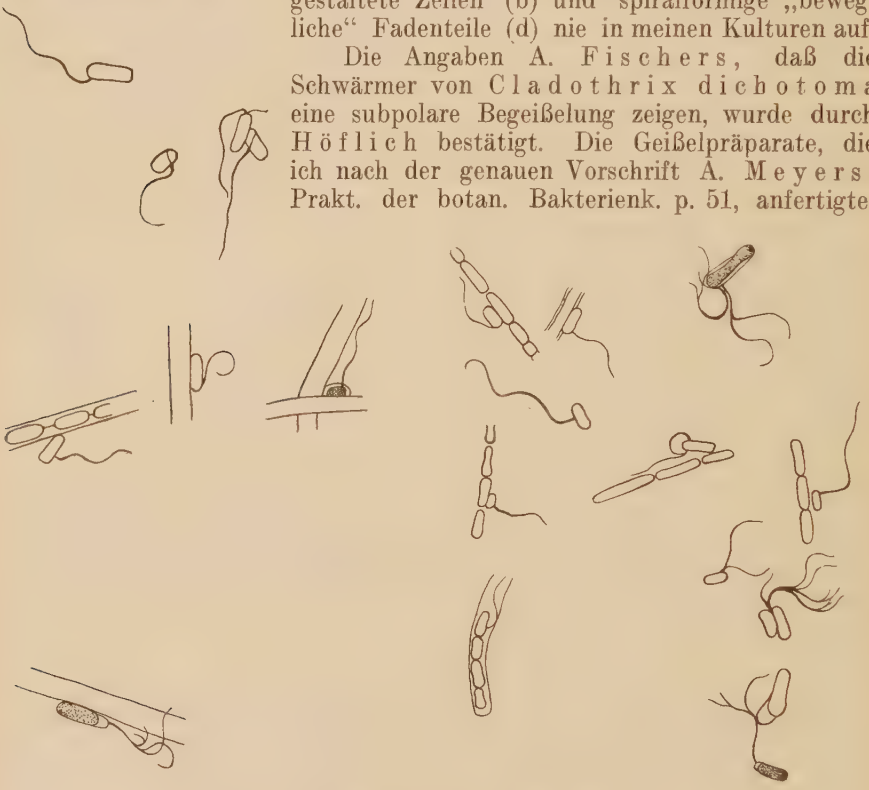

Fig. 6. Schwärmer. Vergr. etwa 700 ×

lieferten gute Bilder und entsprachen den Angaben der beiden Autoren vollkommen. In alkalisch reagierender Gelatine (s. w. u.) gelingt es leicht, große Kolonien von Schwärmern zu züchten. Hebt man diese mit der Gelatine heraus und beobachtet unter dem Deckglas die Schwärmer, die wegen der festen Konsistenz der Gelatine nur langsam rotieren können, so sieht man deutlich, daß schon Querteilungen in den Zellen aufgetreten sind.

Wie B ü s g e n und H ö f l i c h beobachteten, setzen sich die Schwärmer „mittels einer schleimigen Masse“ auf dem Substrat fest. Der Nachweis dieser Scheibe gelingt leicht, wenn man ein steriles Deckglas auf einer Nährlösung schwimmen läßt, nach 24—48 Stunden die anhaftenden Fäden schnell

antrocknet und nach Art der Geißelpräparate beizt und färbt. Die erste Zelle des Fadens ist meist durch einen Zwischenraum von der Scheibe getrennt. Oft erkennt man zwischen der Scheibe und der ersten Zelle einen deutlich gefärbten Faden, nach Art der sonst zwischen den Zellen auftretenden Protoplasmaverbindungen (vgl. Abbild. 3).

Im Anschluß hieran möchte ich auf folgende Beobachtung hinweisen. Wenn man Reinkulturen von Cladothrix, am besten eigneten sich solche in Fleischextraktlösung, etwa 2 Monate bei Zimmertemperatur stehen läßt, so kann man bei mikroskopischer Untersuchung immer einzelne Zellgruppen bemerken, die sich gegenüber den anderen Zellen durch ihre Größe auszeichnen. Die Membran dieser Zellen ist dicker als die der gewöhnlichen Zellen, und darum erscheinen sie wohl von von homogenerem Inhalt, und bei der Färbung mit Methylenblau geht die darauffolgende Differenzierung mit 1 Proz. H_2SO_4 langsamer vor sich. In einer Kultur hatten diese Zellen eine ungewöhnliche Größe gegenüber den anderen Zellen angenommen. Sie zeigten das Bestreben sich abzurunden, doch kamen auch viele Formen vor, die man leicht als Involutionsformen bezeichnen konnte. Während aber fast alle anderen Zellen kein Volutin speicherten, also vielleicht abgestorben waren, zeigten gerade diese Zellen einen Gehalt an „Volutinkörnchen". — Vielleicht hat man in diesen Zellen eine Anpassung des Organismus an ungünstigere Vegetationsbedingungen zu sehen (vgl. Abbild. 7).

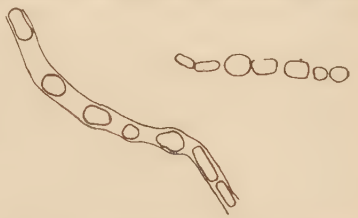

Fig. 7. Eigentümlich deformierte Zellen (Dauerzellen?) aus zwei Monate alten Kulturen. Vergr. etwa 600 ×

Physiologische Versuche.

Höflich hat das Wachstum von Cladothrix in verdünnter Fleischextraktlösung (1000 ccm Wasser, 0,5 g Fleischextrakt) und in Gelatine (40—50 g Gelatine gelöst in 1000 ccm Wasser, 0,5 g Fleischextrakt; die Reaktion soll schwach sauer oder neutral sein) eingehend untersucht und beschrieben, so daß ich auf seine Arbeit betreffs dieser beiden Punkte verweisen möchte, da ich seine Resultate bestätigt fand. Nur folgendes möchte ich noch besonders hervorheben. Bei meinen Versuchen geschah es anfangs, daß ich in Gelatine und Fleischextrakt kein oder nur geringes Anwachsen beobachtete. Die Untersuchung lehrte, daß die geringe Azidität des Nährsubstrats genügte, das Wachstum zu verhindern. Es ist also bei allen Kulturversuchen besonders auf die Reaktion des Nährbodens zu achten. Ein geringer Säuregehalt ist zwar für diesen Organismus erträglich, doch läßt sich der zuträgliche Grad nicht ohne weiteres erkennen, und man unterschätzt ihn leicht. Durch tropfenweisen Zusatz von konz. Na_2CO_3-Lösung kann man die Alkaleszenz des Nährmediums ohne Gefahr so weit treiben, daß eine deutliche Blaufärbung von rotem Lackmuspapier eintritt, da Cladothrix einen ziemlich hohen Alkaligehalt verträgt. Die Konsistenz des Nährbodens ist nicht von so großem Einfluß, da ich noch 0,75—1-proz. Gelatine mit Erfolg verwendete.

Anders verhält es sich dagegen mit einer Reihe von Nährsubstraten, auf denen Höflich kein Wachstum von Cladothrix erzielen konnte. Er war zu dem Resultat gekommen, daß „Cladothrix dichotoma künstlich züchtbar ist in schwachen Bouillon- und dünnen Gelatinelösungen",

alle Versuche auf anderen festen und in flüssigen Nährsubstraten fielen negativ aus. Es schien Cladothrix also außerordentlich wählerisch in bezug auf die Nährsubstrate zu sein.

Meine Versuche ergeben hier eine wesentliche Erweiterung. Zu den Versuchen wurden Erlenmeyerkolben von 150 ccm Inhalt verwandt, die mit 100 ccm Nährlösung beschickt wurden. Mit einem Wattebausch verschlossen, wurden die Lösungen eine Stunde im Dampftopf sterilisiert, dann während 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und danach nochmals eine Stunde sterilisiert. Anfangs wurden die Lösungen nach 24 Stunden, also nach gründlicher Sättigung mit Sauerstoff, geimpft, später zeigte sich jedoch, daß bereits nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur, also nach 2—3 Stunden geimpft werden konnte. Die Kolben wurden im Thermostaten bei 22°—25° C aufbewahrt. Immer wurden bei jeder Versuchsreihe Parallelversuche mit einer Fleischextraktlösung von $\frac{1}{2}{}^0/_{00}$, in der Cladothrix nachweislich wuchs, vorgenommen.

Als Ausgangsmaterial dienten in allen Fällen Kulturen in Fleischextraktlösung, die nie älter als 24—48 Stunden waren.

1. Lösungen von nicht genau kontrollierbarer Zusammensetzung[1]).

Diese Versuche bezogen sich auf Nährlösungen, die einen mehr oder weniger hohen Gehalt an organischen Verbindungen, besonders aber an Eiweißstoffen, enthielten.

1. a) 0,1 g Pepton auf 100 ccm Wasser;
   b) 0,5 g Pepton auf 100 ccm Wasser;
2. 0,5 g Nährstoff Haiden auf 100 ccm Wasser;
3. 500 g gehacktes Rindfleisch in 1 l Wasser gekocht und filtriert;
a) ohne jeden Zusatz;
b) alkalisch durch Zusatz von konz. Na_2CO_3-Lösung;
4. Heuinfus, hellgelbe Lösung, vollkommen durchsichtig;
a) ohne jeden Zusatz;
b) alkalisch durch Na_2CO_3;
5. Heuinfus, kaffeebraune Lösung, kaum durchsichtig;
a) ohne jeden Zusatz;
b) alkalisch;
6. Fleischextrakt 0,5 Proz.
a) ohne jeden Zusatz;
b) alkalisch.

Die Lösungen 1 und 2 zeigten anfangs ein gutes Wachstum von Cladothrix, doch trat nach 2—3 Tagen ein vollkommener Stillstand ein.

In beiden Lösungen unter 3 trat ein kräftiges Wachstum ein, in der alkalischen ein wenig schneller und kräftiger. Beide Kulturen waren von auffallend schleimigem Aussehen. Die Lösungen unter 4 zeigten beide dasselbe kräftige Wachstum wie in Lösungen von Fleischextrakt. In 5 und 6 machte sich der Einfluß der Azidität geltend. In 5 a trat keinerlei Wachstum ein. In 6 a war die Entwicklung äußerst langsam und erst nach einem Monat deutlich bemerkbar, dann aber machte sie große Fortschritte. Die anfangs sauer reagierende Lösung war jetzt alkalisch geworden. Offenbar war der Säuregehalt der Lösung der Entwicklung des Organismus noch gerade zuträglich gewesen, und durch Ausscheidung irgendwelcher alkalisch reagierenden Stoffe war der Säuregehalt allmählich abgestumpft worden und schließlich einer alkalischen Reaktion gewichen. Das Wachstum in dem

[1]) Meyer, A., Praktikum der bot. Bakt. 5.

alkalisch reagierenden Heuaufguß war sehr kräftig. Die entstehenden Flocken waren außerordentlich groß und von schleimiger Konsistenz. Ausgesprochene Hautbildung war wie in allen vorhergehenden Fällen nicht zu beobachten. Dagegen zeigte die 1-proz. Fleischextraktlösung starke Deckenbildung. Die Verflechtung der Fäden war so stark, daß große Teile der Decke herausgehoben werden konnten.

2. Lösungen von genau kontrollierbarer Zusammensetzung.

a) Stickstoff in Form organischer Verbindungen.

Als Stickstoffquelle diente in den ersten Versuchsreihen eine organische Verbindung von genau bekannter Zusammensetzung: Das Asparagin. Die nötigen Mineralstoffe wurden geboten durch eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung (vgl. Meyer, Praktikum d. botan. Bakterienk. p. 15).

1 g KH_2PO_4, 0,1 g $CaCl_2$, 0,3 $MgSO_4 + 7\ H_2O$, 0,1 g NaCl, 0,01 g Fe_2Cl_6 gelöst in 1 l Wasser.

Die Reaktion dieser „mineralischen" Nährlösung ist schwach sauer. Die Versuche mit dieser Nährlösung hatten alle ein negatives Ergebnis, selbst wenn das Asparagin durch Fleischextrakt ersetzt wurde. Die Untersuchung ergab, daß wiederum die geringe Azidität das Wachstum vollständig verhindert hatte. Denn wurde diese Lösung durch Zusatz von konz. Lösung von Na_2CO_3 alkalisch gemacht, so war in solchen Lösungen immer ein starkes Wachstum zu beobachten. Außerordentlich kräftiger war das Wachstum in solchen Lösungen, die neben dem Asparagin noch als besondere Kohlenstoffquelle Zusätze von Rohrzucker, Glukose und Glyzerin enthielten.

Da die Azidität der mineralischen Nährlösung hauptsächlich bedingt wird durch die saure Reaktion des KH_2PO_4 in wässriger Lösung, so wurde in der oben angeführten Lösung das KH_2PO_4 ersetzt durch K_2HPO_4, das Kaliumdiphosphat, das in wässriger Lösung eine alkalische Reaktion zeigt. Wie zu erwarten war, trat in der nun alkalisch reagierenden Nährlösung nach Zusatz von Asparagin ein kräftiges Wachstum auf.

Als vollkommen entbehrlich erwies sich bald der Zusatz von Fe_2Cl_6. In Lösungen, die selbst einen erheblichen Zusatz von Fe_2Cl_6 enthielten, zeigten die Scheiden nie Verfärbung durch Einlagerung von Eisenhydraten. Wenn man auch oft die Verfärbung der Scheiden durch Einlagerungen an Material von natürlichen Standorten beobachtet hat, so ist dies wohl auf rein mechanische Ursachen zurückzuführen und physiologisch von keiner Bedeutung.

b) Stickstoff in Form von anorganischen Salzen.

Da dieser Teil der Untersuchungen einen besonders wichtigen Beitrag zur Physiologie von Cladothrix dichotoma brachte, so sei hier nochmals die mineralische Nährlösung in ihrer veränderten Zusammensetzung, wie sie sich als Resultat der Untersuchungen unter II a ergab, angeführt:

Es wurden gelöst in 1000 Tl. dest. Wasser:

1 g K_2HPO_4, 0,3 g $MgSO_4 + 7\ H_2O$, 0,1 g NaCl und 0,1 g $CaCl_2$.

Fügt man zu diesen mineralischen Salzen als Stickstoffquelle etwa 0,15 Proz. KNO_3 und als Kohlenstoffquelle etwa 0.2 Proz. Rohrzucker ($C_{12}H_{22}O_{11}$), so erhält man eine Nährlösung, die dem Wachstum von Cladothrix

außerordentlich zuträglich ist. Die Menge der Cladothrix-Massen war in solchen Lösungen bedeutend stärker als in den üblichen Fleischextraktlösungen und den sonst unter 1 aufgeführten Nährlösungen mit Ausnahme etwa des starken Heuinfus und der starken Fleischextraktlösung. Charakteristisch gegenüber den Lösungen mit organischen Stickstoffquellen war, daß es nie zur Bildung einzelner, frei flottierender Flocken kam, sondern das Ganze bildete zusammenhängende, dichte Fadenmassen von schleimigem Aussehen.

An Stelle der Nitrate wurden Ammoniumsalze (NH_4Cl, $(NH_4)_3PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$) mit gleichem Erfolge verwandt.

Als Vorlage bei der Herstellung der verschiedenen Nährlösungen diente die in A. Meyers „Praktikum der botan. Bakterienk. p. 24" angeführte Tabelle. Doch mußten hier Abänderungen getroffen werden, da in diesen Lösungen mit einem Gehalt von 1 Proz. KNO_3 oder $(NH_4)Cl$ neben den mineralischen Salzen und den Kohlenhydraten kein Wachstum eintrat, da sie osmotisch so stark wirksam sind, daß die für diesen Organismus erträgliche Grenze, die nach Fischers Untersuchungen bereits bei 1,25 Proz. NaCl liegt, wohl bereits überschritten wird (vgl. A. Fischers Angaben über Plasmolyse der Bakterien). Als Kohlenstoffquelle erwiesen sich neben dem bereits erwähnten Rohrzucker noch folgende Stoffe als brauchbar:

1. Glyzerin, konz., 8 Tropfen auf 100 ccm Lösung.
2. Mannit, 2 Proz.
3. Die Hexosen: d-Glukose, besonders gut auch Galaktose.
4. Die Diosen: besonders gut Rohrzucker, weniger gut Laktose, geringes Wachstum wurde erzielt mit Maltose.

An höher molekularen Kohlenhydraten wurden versucht: Dextrin, Gummi arabicum, Weizen- und Reisstärke, Inulin und Zellulose. Die Versuche mit der letzten (5.) Gruppe hatten ein vollkommen negatives Ergebnis. Cladothrix dichotoma ist also nicht imstande, diese Gruppe der höher molekularen Kohlenhydrate abzubauen, und auch bereits unter den Diosen befinden sich Zuckerarten, die, wie dies für die Maltose zutrifft, von dem Organismus schwer assimiliert werden können.

3. Feste Substrate.

Über das Wachstum auf Gelatine vergleiche man die Angaben Höflichs. Um Cladothrix auf Agarplatten zu kultivieren, eignet sich am besten ein Agar von folgender Zusammensetzung: in 1 l Wasser werden 10 g Agar gelöst und mit ½ g Fleischextrakt versetzt. (Die meist schwach saure Reaktion des Nährbodens ist dem Wachstum nicht schädlich, doch wird durch alkalische Reaktion das Wachstum gefördert.) Da eine Verflüssigung des Substrats nicht eintritt, so kann man auf Agarplatten Rasen von größerem Umfange erzielen als auf Gelatineplatten. Sorgt man etwa durch Aufbewahren der Platten in einer feuchten Kammer dafür, daß kein Eintrocknen des Nährsubstrats eintritt, so kann man leicht Rasen von 10 cm Durchmesser erzielen. Der Fortschritt des Wachstums wird durch eine leichte Trübung des Mediums gekennzeichnet. Die Fäden dringen nicht tief in das Substrat ein. Ähnlich wie auf Gelatineplatten zeigen die Fäden oft spiralige Windungen mannigfaltigster Art, die wohl nicht allein durch die Konsistenz des Nährmediums bedingt werden, da sie auch in Wasserkulturen zahlreich auftreten. Besonders charakteristisch für das Wachstum auf Agarplatten ist das schneckenartige Aufwinden der Fäden auf der Oberfläche des Substrats. Es kommt oft vor, daß einzelne Fäden 3—4 konzentrische Kreise bilden.

Nach den Angaben Schikorras über die Kultur des Sphaerotilus fluitans benutzte ich auch folgenden Agar: Auf 1 l Wasser kamen 15 g Agar, 10 g Pepton, 10 g Fleischextrakt. Also ein Agar von viel festerer Konsistenz und reicherem Gehalt an Nährsalzen als der vorige. Das Wachstum, das hier beobachtet wurde, war ganz verschieden von dem auf dem vorigen Agar. Makroskopisch beobachtete man eine feste, undurchsichtige Decke von schmutzig weißem Aussehen, die außerordentlich langsam heranwuchs. Mikroskopisch zeigte sich, daß der Organismus streng auf der Oberfläche gewachsen war. Die einzelnen Fäden bildeten ein dichtes Geflecht von einzelnen zu Knäueln vereinigten Fäden. Sporenbildung, wie sie Schikorra bei seinen Untersuchungen sah, wurden auch an dieser Form nicht beobachtet, Fett und Volutin bildeten wieder die charakteristischen Inhaltsbestandteile (vgl. Schikorra).

Versuche, Cladothrix auf Kartoffelscheiben zu kultivieren, hatten keinen Erfolg.

Temperatur.

Höflich hat das Temperaturoptimum zwischen 25° und 30° C liegend bestimmt. Kolkwitz, der Cladothrix und Sphaerotilus identifiziert, gibt nach seinen Beobachtungen an natürlichen Standorten an, daß Sphaerotilus besonders gut bei niederen Temperaturen gedeiht, so daß z. B. bei 4° C die Reinigung der Abwässer durch Sphaerotilus noch lebhaft stattfindet. Eine ähnliche Angabe macht Schikorra über seinen Sphaerotilus fluitans dahingehend, daß noch bei 1° C eine üppige Vegetation des Pilzes zu beobachten ist. Meine eigenen, aus Reinkulturen gewonnenen Beobachtungen stimmen mit denen Höflichs überein, nur muß ich das Optimum auf 30°—35° C verlegen. Bei dieser Temperatur gedieh Cladothrix so üppig, daß man bereits nach 2—3 Stunden makroskopisch einen deutlichen Fortschritt in der Entwicklung beobachten konnte. Auch noch bei 37° war ein schwaches Wachstum ähnlich dem bei unter 20° zu beobachten. Das Maximum liegt zwischen 37° und 40° C, oberhalb 40° findet ein Wachstum nicht mehr statt.

Wachstumsversuche bei niedrigen Temperaturen gaben eine starke Abweichung von den Beobachtungen an natürlichen Standorten, vorausgesetzt, daß die Identität von Sphaerotilus und Cladothrix zutrifft. Unterhalb 10° konnte ich ein Wachstum der Kulturen nicht mehr beobachten. Vielleicht wird aber diese Abweichung bedingt durch die ganz anderen Verhältnisse in künstlichen Kulturen. Besonders macht sich hier wohl geltend der reiche Gehalt an Sauerstoff in fließenden Gewässern und wohl auch die schnelle Entfernung der Stoffwechselprodukte und die schnelle Zuführung frischen Nährungsmaterials.

Als Ergänzung hierzu möchte ich folgenden Befund angeben, der die Angaben von Kolkwitz vollkommen bestätigt. Im März dieses Jahres sammelte ich (in Johannisthal auf dem rechten Ufer der Spree, rechts neben der Treskowbrücke) Material von Sphaerotilus natans. Die Temperatur des Wassers betrug erst wenige Grade über 0, und gerade dieser Umstand hatte die Vegetation des Sphaerotilus derart begünstigt, daß ich hier dem Wasser große Rasen entnehmen konnte, die fast nur aus Sphaerotilus pflänzchen bestanden. In dem äußeren Habitus konnte ich keinen Unterschied zwischen dieser und der von mir beobachteten Form erkennen. Die Inhaltsbestandteile der einzelnen Zellen waren Fett und Vo-

lutin. Hin und wieder beobachtete ich, daß bis zu drei Fäden in einer gemeinsamen Scheide lagen (vgl. hierzu über „Pleomorphismus").

Titrierung des zuträglichen Säuregehalts.

Da Cladothrix besonders der Azidität der Nährlösung gegenüber eine so große Empfindlichkeit zeigte, und diese Frage auch für den Abwasserbiologen von einigem Interesse ist, habe ich versucht, den zuträglichen Säuregehalt durch Titrieren mit einer 1/10-normal Natronlauge zu bestimmen. Als Nährlösung diente folgende Zusammensetzung:

In 1 l Wasser wurden gelöst:

1 g HK_2PO_4, 0,3 g $MgSO_4 + 7\ H_2O$, 0,1 g $CaCl_2$, 0,1 g NaCl und 2 g $C_{12}H_{22}O_{11}$ (Rohrzucker), 1,5 g KNO_3.

Als Indikator diente Phenolphtalein. Der Umschlag war nicht sehr scharf.

Ein Gehalt von $^1/_{200}$-normal wurde noch gut ertragen, wenig darüber hinaus trat schon ein zögerndes, krankhaftes Wachstum auf. Vollkommen verhindert wurde das Wachstum durch einen Gehalt von $^1/_{140}$-normal H_2SO_4.

Letzteres entspricht etwa einem Tropfen konz. H_2SO_4 auf 150 ccm Lösung.

Sauerstoffbedürfnis.

In Übereinstimmung mit den Angaben Höflichs gelang es nicht, in Fleischextraktlösungen bei Luftabschluß Wachstum zu erzielen.

Eine andere Versuchsreihe zielte darauf ab, die Frage zu untersuchen, ob Cladothrix dichotoma wie vielen anderen Bakterien denitrifizierende Eigenschaften zukämen. Reagensröhrchen wurden etwa bis zu $^1/_4$ mit der oben angeführten nitrathaltigen Nährlösung gefüllt, und einige von ihnen nach der Buchnerschen Methode (Pyrogallussäure und Kalilauge) luftdicht verschlossen. In allen so abgeschlossenen Röhrchen war kein Wachstum zu beobachten, während in den anderen immer eine kräftige Entwicklung eintrat.

Cladothrix dichotoma ist also obligat aërob.

Pleomorphismus.

Die Angaben Zopfs über den Pleomorphismus von Cladothrix dichotoma konnten durch die Untersuchungen von Büsgen, Winogradsky und Höflich nicht bestätigt werden (vgl. Einleitung). Dagegen konnte Ellis die Beobachtungen Zopfs in weitgehender Weise unterstützen. Wenn er auch nicht alle die von Zopf angegebenen als in den Entwicklungsgang von Cladothrix gehörigen Formen beobachten konnte, so hat er doch unter anderem deutlich gesehen, wie sich von einem Cladothrixfaden eine typische Spirillenform loslöste, so daß er zu der festen Überzeugung kam, daß die von Zopf beschriebenen Spirillenformen in den Entwicklungsgang der Cladothrix dichotoma gehörten. Wie er angibt, wurden die Beobachtungen nicht in einer Reinkultur gemacht.

Die Untersuchungen, die ich bezüglich dieser Frage anstellte, zielten darauf ab, vor allem die folgenden beiden Punkte zur Entscheidung zu bringen. Durch Abänderung der Ernährungsbedingungen wollte ich einmal versuchen, ein Zoogloeastadium zu züchten. Wenn die Annahme Zopfs,

daß die Zoogloea ramigera in den Entwicklungsgang der Cladothrix gehörte, wirklich den Tatsachen entsprach, so garantierte dies beinahe den Erfolg. Ebenso mußte es gelingen, die Sphaerotilus-Form zu erhalten. Für die letztere erwartete ich als Charakteristika besonders die Vereinigung vieler Fäden in einer gemeinsamen Scheide und eine weniger große Festigkeit der Scheide. Ein drittes Merkmal, ein größerer Abstand der einzelnen Zellen innerhalb der Scheide, kann wohl kaum in Betracht kommen, da solche Abstände in alten Kulturen immer auftreten (vgl. Migula).

Für die Zusammensetzung der verschiedenen Nährlösungen war natürlich die Bestimmung maßgebend, daß nicht etwa durch irgendwelche Stoffe eine ungünstige Beeinflussung der Kulturen stattfand und so krankhaft veränderte Formen gezüchtet wurden. Da nach den Angaben von Kolkwitz Sphaerotilus natans und die Zoogloea ramigera besonders in der polysaproben Zone auftreten, so war hier eine Abänderung in der Richtung gegeben, daß die Nährlösungen einen besonders hohen Gehalt an Eiweißstoffen aufwiesen. Es wurden daher besonders Fleischextraktlösungen in verschiedenen Konzentrationen versucht. In einer 1-proz. Lösung, die einen gelblichbraunen Farbenton zeigte und die schon einen Gehalt an Nährstoffen aufweist, wie er an natürlichen Standorten kaum noch vorkommen dürfte, trat (vgl. oben) ein typisches Deckenwachstum auf. Irgendwelche besonderen Formen konnten aber nicht beobachtet werden.

Eine eigentümliche Beobachtung beim Wachsen der Form auf Gelatineplatten legte eine Abänderung in einer noch anderen Richtung nahe. Wenn man nämlich die Alkaleszenz der Gelatine durch tropfenweisen Zusatz von konz. Na_2CO_3-Lösung erheblich weit treibt, so beobachtet man folgende Eigentümlichkeit. Impft man die Gelatineplatte etwa in der Mitte mit einer Cladothrix-Flocke, so ist am folgenden Tage ein beträchtliches Wachstum der Fäden festzustellen. Im Umkreis der angewachsenen Flocke und oft in keiner Verbindung mit den Fäden, erkennt man bald einzelne kleine Kolonien. Sie sind meist von nahezu kugelförmiger Gestalt, doch auch oft außerordentlich unregelmäßig geformt. Ja, Bilder, wie man sie von den lappenförmigen Verzweigungen der Zoogloea ramigera gewohnt ist, sind nicht selten. Auf den ersten Blick glaubt man, Verunreinigungen vor sich zu haben, doch die mikroskopische Untersuchung lehrt, daß es sich um Anhäufungen von Schwärmern handelt. Oft hat es auch den Anschein, als ob einige Fäden direkt in diese Zoogloea-Formen aufgehen.

Der Gedanke lag nahe zu versuchen, diese Wuchsform auch in flüssigen Nährmedien hervorzurufen. In der Tat könnte ja auch die alkalische Reaktion des Wassers diese Art des Wachstums an natürlichen Standorten veranlassen. Die Alkaleszenz der Nährlösungen wurde durch Zusatz von konz. Na_2CO_3-Lösung allmählich gesteigert. Diese Steigerung wurde schließlich so weit getrieben, daß das Wachstum vollkommen verhindert wurde. Wiederum trat in keiner der verschiedenen Kulturen eine besondere Wuchsform auf. Die Erklärung des sonderbaren Wachstums in der Gelatine ist wohl somit allein in der festeren Konsistenz dieser zu suchen. Wurden solche Schwärmermassen in der Gelatine haftend untersucht, so genügte ein geringer Druck auf das Deckglas, um die Schwärmer zu zerstreuen, ein Beweis dafür, daß sie allein durch die Festigkeit der Gelatine zusammengehalten wurden. Im Gegensatz hierzu sind die Zellen der Zoogloea rami-

gera von einem zähen Schleim umhüllt, der ein schnelles Zerfallen unmöglich macht.

Das völlig negative Resultat dieser Untersuchungen kann natürlich nicht als Beweis dafür gelten, daß die Zusammengehörigkeit der Zoogloea ramigera und der Cladothrix dichotoma nicht bestehe; immerhin wird sie hierdurch außerordentlich unwahrscheinlich gemacht.

Es sei hier nochmals betont, daß auch in diesen Kulturen keine echten Spirillen auftraten, die Beobachtungen von Ellis also nicht bestätigt werden konnten.

Über Sphaerotilus natans standen mir an Literatur und Abbildungen in der Hauptsache die Angaben von Kolkwitz zur Verfügung (vergl. auch „Zur Lebensgeschichte von Sphaerotilus natans", Separatabdr. a. d. Zeitschr. d. Ver. f. Deutsch. Zuckerind. Bd. 62. 1912. H. 680). Abgesehen von der großen Differenz in der Lage des Temperaturoptimums, konnte ich einen Unterschied zwischen beiden Formen nicht erkennen. Daß sich diese Abweichungen vielleicht durch die veränderten physiologischen Bedingungen in künstlichen Kulturen erklären, wurde schon oben erwähnt. Die besonders bei Migula und im „Lafar" angeführten Unterscheidungsmerkmale des Sphaerotilus gegenüber Cladothrix, das Wachstum mehrerer Zellreihen in einer gemeinsamen Scheide und die zarte und schleimige Konsistenz der letzteren, scheinen mir vollkommen relativ und nur bedingt durch biologische Verhältnisse. Bei genauer Untersuchung fand ich oft an meinem Material bis zu drei Zellreihen in gemeinsamer Scheide liegend und diese selbst zeigte in ein und derselben Kultur alle Übergänge von äußerst zarter Konsistenz bis zu großer Festigkeit bei einer Gesamtbreite des Fadens von 6 μ. In Übereinstimmung mit dieser Annahme steht auch die Tatsache, daß bei reicher Nahrungszufuhr schon makroskopisch der Habitus der Cladothrix-Büschel ein schleimiges, zottiges Aussehen annimmt, wie dies charakteristisch ist für Sphaerotilus natans (man vgl. vor allem die Abbild. bei Kolkwitz in „Lafar". Bd. 3. Taf. X).

Bemerken möchte ich noch, daß außer Kolkwitz auch Ellis auf Grund eigener Beobachtungen und der Angaben in der Literatur der Überzeugung Ausdruck gibt, daß Sphaerotilus natans und Cladothrix dichotoma identische Organismen sind.

Endlich soll hier noch kurz die Verwandtschaft der Cladothrix zu anderen Bakterien charakterisiert werden. In neuerer Zeit sind nämlich gegen die Stellung der Cladothrix dichotoma im System von einigen Forschern Einwände erhoben worden. Auf Grund der Morphologie und der Entwicklungsgeschichte bestreiten sie die Zugehörigkeit der Cladothrix zu den echten Bakterien und wollen überhaupt die ganze Gruppe der „Chlamydobakterien" von den „Bakterien" trennen. So „schaltet" Miehe die Gruppe „der echten Fadenbakterien" ganz aus dem System aus (Handwörterb. d. Naturwissenschaft. Bd. 1. p. 875). A. Meyer schreibt über die Fadenbakterien: „Die meisten Spezies besitzen Außenmembranen, in denen die Oidien verschiebbar sind. Mir scheinen sie doch wesentlich verschieden von den Organismen zu sein, die ich als Eubakterien zusammenfassen möchte" (Zelle d. Bakt. p. 1). Demgegenüber möchte ich betonen, daß ich auf Grund meiner Untersuchungen mich von der so

„wesentlichen“ Verschiedenheit der Eubakterien und der Cladothrix dichotoma nicht überzeugen konnte, vielmehr scheint mir eine weitgehende Übereinstimmung beider Gruppen in den Hauptmerkmalen zu bestehen, so daß die althergebrachte Ansicht, daß die Fadenbakterien eine Gruppe hochentwickelter Bakterienformen darstellen und mit diesen in ein System zu stellen sind, immer noch berechtigt scheint. Diese Ansicht stützt sich einmal auf die Morphologie und Organisation der Zellen. Wie ich schon oben bemerkte, sind aus der Gruppe der „Eubakterien“ viele Formen beschrieben, deren Zellstruktur mit der von Cladothrix gut übereinstimmt, vor allem die Gestalt und Lagerung der Chromatinkörnchen und die Ausbildung von Kuppen an den Polen. Die Reservestoffe sind dieselben wie sie auch bei „Eubakterien“ angetroffen werden (etwa bei Spirillum volutans). Ferner kommt in Betracht die Form und der Ansatz der Geißeln (vgl. besonders Spirillum sputigenum). Hier läßt sich nicht bestreiten, daß sie denen der Spirillen weitgehend ähneln.

Die wichtigsten Ergebnisse meiner Untersuchungen über die Morphologie und Physiologie von Cladothrix dichotoma lassen sich in folgenden Sätzen kurz zusammenfassen:

Morphologie.

1. Ein einzelner Kern war in den Cladothrixzellen nicht nachzuweisen, statt dessen traten an entsprechend fixiertem und gefärbtem Material „Chromatinkörnchen“ auf, die von den in der Zelle vorhandenen Reservestoffkörnchen scharf unterschieden waren. An den Polen der Zellen waren homogene, körnchenfreie Protoplasmakuppen ausgebildet. — An Reservestoffkörnchen waren vorhanden Volutin und Fett, wie sie auch sonst bei echten Bakterien, z. B. Spirillum volutans, angetroffen werden. Form und Ansatz der Geißeln glichen ebenso denen der echten Spirillen. Es liegt somit keine Veranlassung vor, Cladothrix dichotoma von den Eubakterien (A. Meyer) oder Haplobakterien (A. Fischer) abzutrennen, vielmehr besteht die alte Anschauung, die in den Fadenbakterien hochentwickelte, echte Bakterien sieht, zu Recht.

2. In der äußeren Morphologie der Zellen, ihrer Form und Größe, dem Zusammentritt der einzelnen Zellen zu einem Fadenverbande, der Breite der Scheide, der pseudodichotomen Verzweigung, der Entstehung der Schwärmer und ihrem Auswachsen zu neuen Fäden, konnten im wesentlichen die Angaben früherer Autoren bestätigt werden. (Einzelheiten sind aus der Arbeit zu ersehen.)

3. Die Angaben Ellis' über das Auftreten von echten Spirillen im Entwicklungsgang der Cladothrix dichotoma konnten nicht bestätigt werden. Die Ansicht einiger Autoren, daß die Zoogloea ramigera, eine Bakterienform, die in faulendem Wasser häufig mit Cladothrix dichotoma vereint auftritt, in den Entwicklungsgang von Cladothrix dichotoma gehört, konnte nicht wahrscheinlich gemacht werden. Einige Beobachtungen über das Wachstum von Cladothrixschwärmern in zoogloeaartigen Verbänden er-

gaben auch keine Anhaltspunkte dafür, daß der genetische Zusammenhang beider Formen besteht. In Übereinstimmung mit anderen Autoren bin ich zu der Überzeugung gekommen, daß die in der Literatur als Cladothrix dichotoma Cohn und Sphaerotilus natans Kuetzing beschriebenen Organismen identisch sind.

Physiologie.

1. Die Untersuchungen über die Physiologie von Cladothrix dichotoma wurden sämtlich in Reinkulturen vorgenommen. Die Reinkultur von Cladothrix dichotoma gelingt leicht auf Agar, der mit $^1/_{20}$ Proz. Fleischextrakt versetzt wird und schwach alkalische Reaktion zeigt. Die Abwässerbiologen stellen Cladothrix zu den β-mesosaproben Formen, sie soll somit ihren Bedarf an Kohlenstoff und Stickstoff durch die Assimilation von organischen Verbindungen decken. Versuche in Reinkultur ergaben, daß als Kohlenstoffquelle folgende Stoffe dienen können: Eiweißstoffe und ihre Abbauprodukte, wie Peptone und Aminosäuren; an stickstoffreien Verbindungen: Glyzerin, sechswertige Alkohole (Mannit), besonders Mono- und Disaccharide. Nicht assimiliert werden die polymerisierten Kohlenhydrate wie Stärke, Dextrin usf.

2. Als Stickstoffquelle eignen sich außer organischen Verbindungen auch anorganische Salze: Nitrate und Ammoniumsalze.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Sommersemester 1912 begonnen und im Laufe des Sommersemesters 1913 abgeschlossen. Sie wurden ausgeführt im Botanischen Institut der Universität Berlin unter der Leitung des Herrn Geh. Regierungsrat Prof. Dr. Haberlandt, dem ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und das Interesse, das er meinen Untersuchungen zuwandte, zu größtem Dank verpflichtet bin.

Besonders dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. Benecke, dem ich die Anregung zu dieser Arbeit verdanke und der mich jederzeit in freundlichster Weise unterstützte.

Lebenslauf.

Ich, Paul Franz Emil Linde, wurde am 4. Dezember 1889 zu Berlin als Sohn des Malers Franz Linde geboren. Evangelischer Konfession, besuchte ich seit April 1906 die Luisenstädtische Oberrealschule zu Berlin, die ich Ostern 1909 mit dem Zeugnis der Reife verließ. Gleichzeitig ließ ich mich an der Universität Berlin immatrikulieren, um mich dem Studium der Naturwissenschaften, speziell der Botanik, zu widmen. Am 24. Juli 1913 bestand ich die Promotionsprüfung.

Ich hörte bzw. arbeitete bei folgenden Professoren und Dozenten: Ascherson, Benecke, Claußen, Engler, v. Guttenberg, Haberlandt, Schwendener, Brauer, Deegener, Hertwig, Heymons, Poll, F. E. Schultze, Blasius, Branca, Gabriel, Liebisch, Nernst, Marckwald, Rosenheim, Rubens, Knoblauch, Lehmann-Filhés, H. Schwarz, Erdmann, Kuntze, Lasson, Stumpf, Meyer, Harnack.

Allen meinen hochverehrten Lehrern spreche ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aus.

Fürstlich priv. Hofbuchdruckerei (F. Mitzlaff)
Rudolstadt.